

**NORMA
VENEZOLANA**

**COVENIN
2986-93**

**AGUA POTABLE. DETERMINACIÓN
DE PSEUDOMONAS AERUGINOSA
POR EL METODO DEL NUMERO
MAS PROBABLE**



PROLOGO

La Comisión Venezolana de Normas Industriales (COVENIN), creada en 1958, es el organismo encargado de programar y coordinar las actividades de Normalización y Calidad en el país. Para llevar a cabo el trabajo de elaboración de normas, la COVENIN constituye Comités y Comisiones Técnicas de Normalización, donde participan organizaciones gubernamentales y no-gubernamentales relacionadas con un área específica.

La presente norma fue elaborada por el Comité Técnico de Normalización CT 10 y aprobada por la COVENIN en su reunión No 123 de fecha 13/10/93



NORMA VENEZOLANA
AGUA POTABLE
DETERMINACION DE Pseudomonas aeruginosa
POR EL METODO DEL NUMERO MAS PROBABLE

COVENIN
2986-93

1 NORMAS COVENIN A CONSULTAR

- COVENIN 1126-89 Alimentos. Identificación y preparación de muestras para el análisis microbiológico.
- COVENIN 2614-89 Agua potable. Toma de muestras.

2 OBJETO Y CAMPO DE APLICACION

Esta Norma Venezolana contempla el método de ensayo de rutina para la determinación del número más probable de Pseudomonas aeruginosa en agua potable envasada.

3 PRINCIPIO DEL METODO

El método consiste en inocular volúmenes conocidos de una muestra de agua potable envasada en c/u de 5 ó 10 tubos de ensayo, con un medio de cultivo no selectivo, doble concentrado. Después del período de incubación se observan los tubos que presentan un pigmento fluorescente verde, se confirman en un medio selectivo, y se obtiene el NMP de Pseudomonas aeruginosa utilizando las tablas diseñadas para tal fin.

4 EQUIPOS E INSTRUMENTOS

- 4.1 Equipo para la preparación de muestras (según Norma Venezolana COVENIN 1126).
- 4.2 Incubadora con regulador de temperatura
- 4.3 Lámpara de luz ultravioleta de onda larga
- 4.4 Porta-asa y asa de platino
- 4.5 Tubos de 150 x 20 mm, y 150 x 15 mm.
- 4.6 Equipo de uso común en el laboratorio.

5 MEDIOS DE CULTIVO

- 5.1 Caldo Asparagina, doble concentrado
- 5.2 Agar o caldo Acetamida

6 MATERIAL A ENSAYAR

El material a ensayar consiste en una muestra representativa del agua potable envasada, tomada según la Norma Venezolana COVENIN 2614.

7 PROCEDIMIENTO

7.1 La muestra se identifica y prepara según la Norma Venezolana COVENIN 1126

7.2 PRUEBA PRESUNTIVA

7.2.1 Se inoculan volúmenes de 10 ml de muestra en cada uno de 5 tubos que contienen Caldo Asparagina, doble concentrado. Se mezcla suavemente.

NOTA 1: Si se requiere mayor precisión en el método, se inoculan 10 tubos

7.2.2 Se incuban a 35 - 37°C. Después de 24 horas, examine los tubos con lámpara ultravioleta de onda larga, en un cuarto oscuro, a fin de observar la aparición de un pigmento fluorescente verde. En caso de no observar fluorescencia se reincuban por 48 horas o más.

7.2.3 Se consideran como tubos positivos en la prueba presuntiva, aquellos que presenten fluorescencia verde, después del período de incubación.

7.3 PRUEBA CONFIRMATORIA

7.3.1 De los tubos positivos de la prueba anterior, se inocula 0,1 ml en caldo Acetamida o una asada sobre la superficie de Agar Acetamida (en bisel).

7.3.2 Se incuban a 35° - 37°C durante 24 - 48 h.

7.3.3 Finalizado el período de incubación se consideran como tubos positivos en la prueba confirmatoria, aquellos donde se observa la aparición de un color púrpura.

7.3.4 Se cuenta el número de tubos positivos obtenidos y el resultado se lleva a las tablas de número más probable que corresponda (ver tablas del anexo II).

8 EXPRESION DE LOS RESULTADOS

8.1 El resultado se expresa como Número más probable de Pseudomonas aeruginosa por 100 ml de muestra.

8.2 En caso de que todos los tubos sean negativos, el resultado se expresa como "menos de 2,2 o menos de 1,1", según se hayan utilizado 5 ó 10 tubos respectivamente.

8.3 En caso de que todos los tubos sean positivos, el resultado se expresa como "más de 16,0 o más de 23,0", según se hayan inculcado 5 ó 10 tubos respectivamente.

9 INFORME

9.1 El informe del ensayo deberá indicar como mínimo lo siguiente:

9.1.1 Ensayo realizado según la Norma Venezolana COVENIN correspondiente

9.1.2 Fecha en la cual se realizó el ensayo y nombre de quien lo realizó

9.1.3 Identificación de la muestra

9.1.4 Resultados del ensayo

9.1.5 Observaciones

BIBLIOGRAFIA

APHA 1989 Standard Methods for the examination of water and waste - water. 17 th edition. Washington D.C.

APHA 1992 Compendium of methods for the microbiological examination of food. Third edition. Washington D.C.

ANEXO I

1 MEDIOS DE CULTIVO

1.1 CALDO ASPARAGINA

Fórmula:

Asparagina DL	3,0 g
Fosfato Dipotásico anhidro ($K_2 HPO_4$)	1,0 g
Sulfato de Magnesio ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)	0,5 g
Agua destilada	500 ml

Preparación:

Se agregan los ingredientes al agua destilada con agitación continua hasta disolver completamente, se ajusta el pH a 6,9 - 7,2, se reparten en tubos de 150 x 20 mm a razón de 10 ml en c/u, luego se esteriliza en autoclave a 121°C durante 15 minutos.

1.2 CALDO ACETAMIDA

Fórmula:

Acetamida	10,0 g
Cloruro de sodio (NaCl)	5,0 g
Fosfato dipotásico ($K_2 HPO_4$)	0,73 g
Sulfato de Magnesio ($Mg SO_4 \cdot 7H_2 O$)	0,5 g

Rojos fenol	0,012 g
Agua destilada	1000 ml

Preparación:

Se procede de igual forma que para el Caldo Asparagina.

Para la preparación del Agar Acetamida se adiciona a la fórmula anterior 15 g de agar, se hierve hasta disolver el agar, se distribuye en tubos a razón de 8 ml c/u y se esteriliza a 121°C durante 15 minutos. Después de la esterilización se inclinan los tubos para obtener una superficie biselada.

1,10	1,1	1,1	1,1
1,20	1,2	1,2	1,2
1,30	1,3	1,3	1,3
1,40	1,4	1,4	1,4
1,50	1,5	1,5	1,5

ANEXO II

TABLA N° 1

Indices de NMP y límites de confianza de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando se utilizan 5 tubos inoculados con 10 ml de muestra.

No. de tubos positivos	Indice NMP/100ml	Límites de Confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	≤ 2,2	0	6
1	2,2	0,1	12,6
2	5,1	0,5	19,2
3	9,2	1,6	29,4
4	16	3,3	52,9
5	≥ 16	8	Infinito

Tabla N°.2

Indices de NMP y límites de confianza de 95% para varias combinaciones de resultados positivos y negativos, cuando se utilizan 10 tubos inoculados con 10 ml de muestra.

No. de tubos positivos	Indice NMP/100 ml	Límites de Confianza de 95%	
		Inferior	Superior
0	≤ 1,1	0	3
1	1,1	0,03	5,9
2	2,2	0,26	8,1
3	3,6	0,69	10,6
4	5,1	1,3	13,4
5	6,9	2,1	16,8
6	9,2	3,1	21,1
7	12	4,3	27,1
8	16,1	5,9	36,8
9	23	8,1	59,5
10	≥ 23	13,5	Infinito

COVENIN
2986-93

CATEGORIA
B

COMISION VENEZOLANA DE NORMAS INDUSTRIALES
MINISTERIO DE FOMENTO
Av. Andrés Bello Edif. Torre Fondo Común Pisos 11 y 12
Telf. 575. 41. 11 Fax: 574. 13. 12
CARACAS

publicación de:
IMPRESO EN EL TALLER DE COVENIN



CDU: 644.61.579.6:68

ISBN: 980-06-1174-6

Cualquier traducción o reproducción parcial o total de la presente
Norma deberá ser autorizada por el Ministerio de Fomento

Descriptores: Método microbiológico, Agua potable